

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Natalia Božac

7221/PT

NOVE TEHNOLOGIJE IZOLACIJE FENOLNIH SPOJEVA IZ KOMINE MASLINA

Završni rad

**Predmet/istraživanje: Kemija i tehnologija ulja i masti / HRZZ projekt 9550 –
Zelena otapala za zelene tehnologije**

Mentor: doc. dr. sc. *Klara Kraljić*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nove tehnologije izolacije fenolnih spojeva iz komine maslina

Natalia Božac, 0058208616

Sažetak: Komina masline je nusproizvod industrije ulja i masti koja sadrži visok udio fenolnih spojeva, zbog čega je pogodan materijal za njihovu ekstrakciju. Ekstrakcija mikrovalovima kao relativno nova metoda ekstrakcije, ima brojne prednosti nad konvencionalnim metodama. Cilj ovog rada je usporedba mikrovalne ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine maslina te konvencionalne metode po Soxhletu. Ekstrakcijom mikrovalovima postignuto je veće iskorištenje procesa pri značajno kraćem trajanju ekstrakcije i uporabi manjeg volumena otapala u odnosu na konvencionalnu metodu. Zbog značajno kraćeg vremena trajanja metoda je pogodna za ekstrakciju termolabilnih spojeva.

Ključne riječi: komina maslina, fenolni spojevi, mikrovalna ekstrakcija

Rad sadrži: 24 stranice, 3 slike, 3 tablice, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Klara Kraljić

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering

Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

New technologies for the isolation of phenolic compounds from olive pomace

Natalia Božac, 0058208616

Abstract: Olive pomace is a byproduct of oil and fat industry, that is rich in phenolic compounds. That is the reason why olive pomace is suitable material for extraction of phenolic compounds. Microwave assisted extraction, relatively new method, has numerous advantages over conventional methods. The aim of this study was comparison of microwave assisted and conventional, Soxhlet, extraction of phenolic compounds. Microwave assisted extraction provided greater yield in significantly shorter time and using less solvent. Significantly shorter time of this method favored preservation of thermolabile compounds.

Keywords: olive pomace, phenolic compounds, microwave assisted extraction

Thesis contains: 24 pages, 3 figures, 3 tables, 39 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Klara Kraljić, Assistant professor

Defence date: 9th of July, 2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Maslina	2
2.2. Maslinovo ulje	3
2.2.1. Proizvodnja maslinova ulja	4
2.3. Komina masline	5
2.4. Fenolni spojevi.....	6
2.5. Ekstrakcija fenolnih spojeva komine masline.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Materijali	11
3.2. Reagensi	11
3.3. Metode rada	12
3.3.1. Određivanje udjela vode u komini	12
3.3.2. Određivanje udjela ulja u komini	12
3.3.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva metodom po Soxhletu	13
3.3.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva mikrovalovima	13
3.3.5. Određivanje fenolnih spojeva komine masline	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Udio ulja i vode u komini masline	16
4.2. Usporedba konvencionalne metode ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima..	17
5. ZAKLJUČAK.....	21
6.LITERATURA.....	22

1. UVOD

Maslina je jedna od prvih i najčešće kultiviranih biljaka Mediterana. Koristi se prvenstveno za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja, ali i stolnih maslina. Djevičansko maslinovo ulje je namirnica na kojoj se temelji mediteranska prehrana te mu se pripisuju brojna ljekovita svojstva. Glavni nusproizvod njegove proizvodnje jest komina masline. Komina masline nutritivno je vrijedan biljni materijal bogat fenolnim spojevima. Fenolni spojevi najpoznatiji su antioksidansi, ali u visokim koncentracijama štete okolišu. Iz tog razloga nije pogodna za odlaganje u prirodu, stoga se danas pokušavaju pronaći i razviti ekonomski i ekološki prihvatljive metode kojima bi se komina masline mogla zbrinuti i iskoristiti.

S obzirom na visok sadržaj fenolnih spojeva, komina masline je dobar materijal za njihovu ekstrakciju. No konvencionalne metode ekstrakcije su dugotrajne, troše velike količine energije i organskih otapala te dolazi do termičke degradacije fenolnih spojeva. Stoga se razvijaju nove metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ultrazvukom, pulsirajćim električnim poljem te ekstrakcija pomoću ekološki prihvatljivih eutektičkih otapala.

Cilj ovog rada bit će usporediti ekstrakciju fenolnih spojeva iz osušene i usitnjene komine masline pomoću konvencionalne metode po Soxhletu i alternativne metode pomoću mikrovalova, s obzirom na iskorištenje procesa i ekstraktibilnost pojedinih komponenti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Maslina

Maslina (*Olea europea* L.) je višegodišnja zimzelena biljka iz porodice maslina (*Oleaceae* L.). Jedna je od prvih kultiviranih biljaka na području Mediterana. Rod *Olea* podrazumijeva 35 do 40 različitih vrsta rasprostranjenih na području južne Afrike i Azije, istočne Australije, Nove kaledonije i Novog Zelanda (Fabbri i sur., 1995). U Republici Hrvatskoj uzgajaju se domaće sorte Oblica, Lastovka, Bjelica i Buža te sorta Leccino uvedena iz Italije. Sorte se prema namjeni mogu dijeliti na uljne, mješovite i stolne sorte. Kod uljnih sorti omjer pulpe i koštice iznosi od 4:1 do 8:1, a kod stolnih od 7:1 do 10:1. Mješovite sorte mogu se koristiti za dobivanje ulja ili se mogu konzervirati i koristiti za ljudsku prehranu (Balbino, 2014).

Plod masline građen je od kože (epikarpa), pulpe (mezokarpa) i koštice (endokarpa). Unutar koštice nalazi se sjemenka (endosperm). Plod se sastoji od 40-70 % vode, 6-25 % ulja i 24-35 % ostalih sastojaka koji uključuju šećere, bjelančevine, organske kiseline, vlakna, pigmente, minerale, fenolne i druge spojeve. Masa ploda može varirati od 0,5 do 20 g. Pulpa zauzima najveći udio u plodu, od 70 do 81 %. Zatim slijede koštica, sjemenka pa kožica. Stanice pulpe sadrže vakuole u kojima se nalazi ulje. Kod zrelog ploda vakuola može zauzimati i do 80 % stanice. Mali dio ulja nalazi se raspršen u citoplazmi te se ono većinom ne može izdvojiti. Fenolni sastojci ploda masline (bifenoli) su fenolne kiseline i alkoholi te sekoiridoidi. Smještene su u nakupine u blizini stanične stjenke zrelog ploda te se smatra da im je primarna uloga zaštita ploda od mikroorganizama uslijed oštećenja kože. Sjemenka masline sadrži od 35 do 40 % ulja koje je većinom citoplazmatsko. Kožica masline obavijena je masno-voštanom kutikulom te sadrži u većoj mjeri pigmente. Prilikom dozrijevanja poprima od zeleno-žute do ljubičaste boje (Koprivnjak, 2006).

Maslina je jedna od najvažnijih uzgajanih biljaka na Mediteranu gdje se nalazi preko 98 % postojećih usjeva u svijetu, što ukazuje na ekonomsku važnost masline te važnost iskorištavanja nusproizvoda njene prerade (Pereira i sur., 2007).

2.2. Maslinovo ulje

Maslinovo ulje smatra se jednim od glavnih sastojaka mediteranske prehrane i vrlo važnim čimbenikom očuvanja zdrave populacije sa smanjenim udjelom pretilih osoba. Ulje plodova i komine maslina klasificiraju se kao djevičanska maslinova ulja, maslinova ulja i ulja komine maslina (Koprivnjak, 2006). Djevičanska maslinova ulja dijele se na ekstra djevičanska, djevičanska i maslinova ulja lampante. Ekstra djevičansko maslinovo ulje je ulje koje se proizvodi izravno iz ploda masline mehaničkim postupcima te sadrži najviše 0,8 % slobodnih masnih kiselina izraženih kao oleinska masna kiselina. Djevičanska maslinova ulja proizvode se na isti način, ali sadrže do 2 % slobodnih masnih kiselina. Maslinovo ulje lampante je djevičansko maslinovo ulje s više od 2 % slobodnih masnih kiselina i ima neprihvatljiva senzorska svojstva te nije prihvatljivo za ljudsku uporabu. Ulje komine maslina je ulje dobiveno miješanjem rafiniranog ulja komine maslina i djevičanskih maslinovih ulja osim maslinovog ulja lampante, koje ne sadrži više od 1,5 % slobodnih masnih kiselina (Uredba komisije (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize, u daljnjem tekstu Uredba, 1991; Koprivnjak, 2006). Prisustvo slobodnih masnih kiselina u ulju ukazuje na pojavu hidrolitičkog kvarenja ulja. Hidrolitičko kvarenje može započeti već u samom plodu biljke, a odnosi se na cijepanje triacilglicerola na masne kiseline i glicerol djelovanjem vode. Ulja s manjim udjelom slobodnih masnih kiselina imaju veću oksidativnu stabilnost. Naime, slobodne masne kiseline imaju prooksidativna svojstva zbog slobodne karboksilne skupine, koja sudjeluje u raspadu hidroperoksida (prooksidacijsko djelovanje) (Frega i sur., 1999). Također, potiču prijelaz iona metala iz metalnih dijelova strojeva u ulje, stoga nisu poželjne u ulju, unatoč tome što nisu štetne za ljude (Koprivnjak, 2006).

Sastav djevičanskog maslinovog ulja najvećim dijelom čine triacilgliceroli (~99 %). Manji udio odnosi se na slobodne masne kiseline, di- i monoacilglicerole, ugljikovodike, sterole, alifatske alkohole, tokoferole i pigmente te mnoge halpive i fenolne spojeve. Sastav masnih kiselina maslinova ulja ovisi o području proizvodnje, geografskoj širini, klimi, varijetetu biljke i stupnju zrelosti ploda. Masne kiseline koje ulaze u sastav maslinova ulja su palmitinska (16:0), palmitoleinska (16:1), stearinska (18:0), oleinska (18:1), linolna (18:2) i linolenska (18:3). Oleinska kiselina je najzastupljenija te njen udio iznosi od 70 do 80 % (Tripoli i sur., 2005). Analizom uzoraka maslinova ulja iz različitih zemalja utvrđeno je da ulja iz određenih zemalja poput Grčke, Italije i Španjolske imaju nizak udio linolne i palmitinske masne kiseline, a visok udio oleinske, dok ulja iz država poput Tunisa imaju viši udio linolne i

palmitinske, a niži oleinske masne kiseline. Najznačajniji triacilgliceroli u maslinovom ulju su OOO (40-59 %), POO (12-20 %), OOL (12.5-20 %), POL (5.5-7 %) and SOO (3-7 %) (Boskou, 1996).

2.2.1. Proizvodnja maslinova ulja

Za proizvodnju djevičanskog maslinovog ulja koriste se plodovi stabla masline (*Olea europea* L.), koji se podvrgavaju isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjena sastojaka ulja te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. Ekstra djevičansko maslinovo ulje i djevičansko maslinovo ulje može se podvrgnuti isključivo postupcima pranja, centrifugiranja, dekantiranja /ili filtracije (Uredba, 1991). Prije same proizvodnje ulja potrebno je plodove masline pripremiti na način da se odstrane nečistoće prosijavanjem i u struji zraka te pranjem. Proizvodnja ulja započinje mljevenjem i drobljenjem plodova masline u svrhu razbijanja stanične strukture kako bi se iz stanica oslobodilo ulje. Pri tome dolazi i do drobljenja koštica koje stvaraju kanaliće za bolje izdvajanje ulja. Također dolazi i do izdvajanja tvari iz sjemenki i kožica pa one dolaze u međusobni kontakt, što omogućava razne kemijske i biokemijske reakcije koje utječu na svojstva djevičanskoga maslinova ulja. Za mljevenje i drobljenje maslina koriste se razni mlinovi. Kameni mlinovi najčešće se koriste u kombinaciji s hidrauličkim prešama. Zbog malog broja okretaja ($15-20 \text{ o min}^{-1}$) ne dovode do nastajanja emulzija i omogućavaju spajanje kapljica ulja u veće nakupine. Danas se češće koriste metalni mlinovi značajno većeg broja okretaja ($1000-3000 \text{ o min}^{-1}$), zbog čega dolazi do nastajanja emulzija pa se koriste u kombinaciji s centrifugalnim separatorima. Nakon mljevenja i drobljenja provodi se miješenje u svrhu razbijanja emulzije (posebice nakon mljevenja metalnim mlinovima). Separacija ulja iz mase može se vršiti prešanjem, kontinuiranom centrifugalnom ekstrakcijom ili procjeđivanjem.

Prešanje se provodi na hidrauličkim prešama otvorenog tipa. Tim se postupkom dobije uljni mošt, odnosno smjesa vegetabilne vode i ulja. Oni se odvajaju u centrifugalnom separatoru. Prednost je dobivanje relativno male količine otpadne vode. Kontinuirana centrifugalna ekstrakcija temelji se na razlici u gustoćama ulja, vegetabilne vode i komine (krutog ostatka biljnog materijala nakon izdvajanja ulja). Postupak se odvija u dekanterima, koji postoje u dvije izvedbe: s dvije ili s tri faze. Tijekom postupka je nužno dodavati toplu vodu u tijesto, što kasnije dovodi do velikih količina otpadne vode. Procjeđivanje se temelji na razlici u površinskoj napetosti vegetabilne vode i ulja te svojstvima adhezije. Prilikom

postupka postoji velika mogućnost oksidacije ulja zbog velike kontaktne površine između ulja i zraka te zaostaju veće količine ulja (20-30 %) u komini, koje je potrebno naknadno izdvojiti (Koprivnjak, 2006; Škevin, 2016). Ulje zaostalo u komini masline može se izdvojiti ekstrakcijom organskim otapalom, nakon čega se mora rafinirati te se na tržište ne stavlja kao takvo, već se miješa s djevičanskim maslinovim uljem (Uredba, 1991).

2.3. Komina masline

Komina masline jedan je od dva nusprodukta proizvodnje maslinovog ulja. Osim ulja i komine u proizvodnji se dobiva i vegetabilna voda. Dobiva se prešanjem plodova maslina bez kemijskog tretiranja (Cardoso i sur., 2005). Sastoji se od koštica, kožica i pulpe maslina. Najznačajniji sastojci komine masline su ulje, voda, bjelančevine i polifenoli (Brlek Savić i sur., 2009). Kemijski sastav komine maslina prikazan je u tablici 1. Sastav komine masline, osim o sorti masline, ovisi i o načinu proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja. Ukoliko se ulje dobiva prešanjem na hidrauličkim prešama, komina masline ima nizak udio ulja i vegetabilne vode (Škevin, 2016). Centrifugalnom ekstrakcijom s tri faze dobije se komina s nižim udjelom vode i višim udjelom ulja u usporedbi s centrifugalnom ekstrakcijom s dvije faze (Alburquerque i sur., 2004).

Tablica 1. Kemijski sastav komine masline (Brlek Savić i sur., 2009)

Parametar	Udio (%)
Voda	20-25
Bjelančevine	4,5-9
Vlakna	40-55
Ulje	2-10
Pepeo	3-6

Industrija proizvodnje maslinovog ulja u mediterasnkim zemljama producira velike količine otpada, ovisno o načinu izdvajanja ulja iz masline. Na primjer, u Španjolskoj se najčešće koristi dvofazna centrifugalna ekstrakcija pri čemu nastaju velike količine vlažne komine. Ta komina ima niski pH te sadrži fenolne i lipidne frakcije, koje su pokazale fitotoksična i antimikrobna svojstva kada se takva komina koristi kao dodatak gnojivu. Takva se komina podvrgava drugoj centrifugalnoj ekstrakciji ili se suši i ekstrahira organskim otapalima kako bi se izdvojilo preostalo ulje te spaljuje u svrhu dobivanja toplinske ili električne energije u samom pogonu za proizvodnju ulja ili izvan njega. Danas se razvijaju alternativne, jeftine tehnologije za recikliranje organskog otpada. Jedna od njih je kompostiranje pri čemu se komini dodaje gnojivo i spojevi s fosforom i željezom, što dovodi do degradacije polifenola, hemiceluloze, organskih ugljikovodika, lipida i slično (Tortosa i sur., 2012).

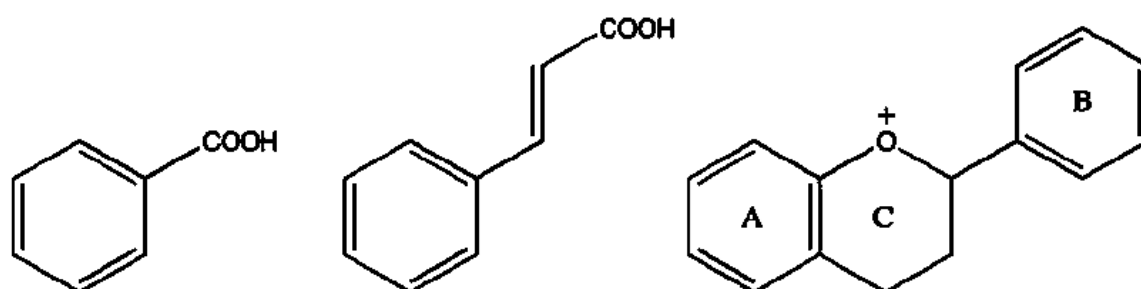
Komina masline može se upotrijebiti za dobivanje energije biokemijski i termokemijski. Biokemijska proizvodnja energije odnosi se na anaerobnu fermentaciju uz proizvodnju bioplina, a termokemijska na sagorijevanje u pećima za biomasu. Prije termokemijskog sagorijevanja komina se peletira, odnosno sabija u cilindrični oblik. Pri tome ne smije imati više od 15 % vode kako bi se osigurala stabilnost i veća energetska vrijednost peleta. Zatim se takvi peleti sagorijevaju u pećima za biomasu pri čemu nastaju vrući plinovi. Ti se plinovi koriste za zagrijavanje medija koji pokreću kongeneracijska postrojenja (istovremena proizvodnja toplinske i električne energije). Takav proces sagorijevanja ne utječe na povećanje koncentracije ugljikovog dioksida u zraku, zato što maslina sagorijevanjem otpusti podjednaku količinu CO₂, koju je apsorbirala tijekom rasta. Energetska vrijednost komine maslina podjednaka je energetske vrijednosti ugljena i drva, zbog čega se smatra visoko vrijednim energentom. S obzirom da je komina masline nepogodna za odlaganje u prirodu u obliku otpada te da vlada nestašica fosilnih goriva, uporaba komine masline kao energenta predstavlja dobro rješenje tih problema (Brlek Savić i sur., 2009).

2.4. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi, sekundarni biljni metaboliti, najbrojnija su i najraširenija grupa spojeva u višim biljkama. Poznato je više od 8000 struktura fenolnih spojeva. Fenolni spojevi u biljkama imaju fiziološku ulogu, uključeni su u rast i reprodukciju biljke te služe za obranu

od ultraljubičastog zračenja te biljojeda i patogena (Bravo, 1998). U biljkama su najčešće prisutni u obliku glikozida i estera. Udio fenolnih spojeva u biljkama ovisi o varijetetu, klimatskim uvjetima, stupnju zrelosti i brojnim drugim faktorima. Fenolni spojevi u hrani značajni su zbog svoje antioksidacijske aktivnosti. Ona ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u molekuli te o pH vrijednosti medija (Belitz i sur., 2009).

S obzirom na strukturu, najčešća je podjela na flavonoide i neflavonoide. Struktura flavonoida je heterociklička: sastoji se od dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana lancem od tri ugljika, koji tvori piranski prsten (C) s prvim benzenskim prstenom. Općenita struktura flavonoida prikazana je na slici 1. S obzirom na oksidacijsko stanje središnjeg prstena flavonoidi se dalje dijele na flavonole, flavone, flavanone, antocijanidine (katehini i proantocijanidini), flavanole, i izoflavone (Daglia, 2012). Flavonoidi su pigmenti topljivi u vodi i nalaze se u vakuolama stanice. U višim biljkama imaju ulogu u fiksaciji dušika, pigmentaciji cvjetova, filtraciji ultraljubičastog zračenja te ako kemijski glasnici, fiziološki regulatori i inhibitori staničnog ciklusa. Povezani su s visokom antioksidativnom aktivnošću određene hrane te sa smanjenim rizikom od kardiovaskularnih bolesti (Kabera i sur., 2014).



Slika 1. Kemijska struktura benzojeve i cimetne kiseline te flavanoida (Khoddami i sur., 2013).

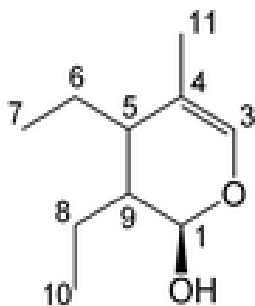
Neflavonoidi dijele se na fenolne kiseline, stilbene i lignane (Daglia, 2012). Fenolne kiseline dijele se na derivate benzojeve i derivate cimetne kiseline (Manach i sur., 2004), čija je struktura također prikazana na slici 1. Hidroksibenzojeve kiseline manje su zastupljene u biljkama koje se koriste za ljudsku prehranu. Najznačajniji predstavnici ove skupine su salicilna, genska, galna, vanilinska, elaginska, protokatehinska i 4-hidroksibenzojeva kiselina. Najčešće dolaze kao sastavni dio kompleksnih molekula tanina, ponajviše galna kiselina- (Belitz i sur., 2009). Hidroksicimetne kiseline zastupljenije su od hidroksibenzojevih. Najznačajniji predstavnici te skupine su sinapinska, *p*-kumarinska, kavka i ferulinska.

Najčešće se nalaze u obliku glikozidnih derivata ili estera vinske, šikimične i kavske kiseline (Manach i sur., 2004).

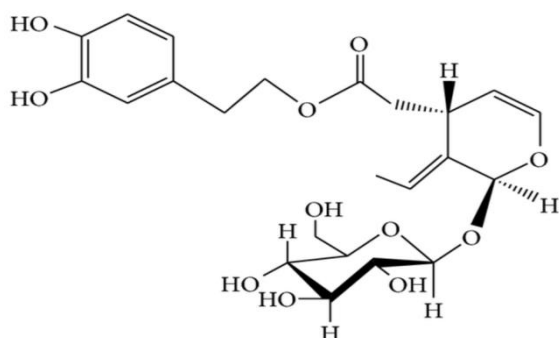
Lignani su građeni od dvije fenolpropanske jedinice. Razlikuju se prema oksidacijskom stanju bočnog lanca i skupinama vezanim za aromatske prstene. Prvi benzenski prsten u molekuli numerira se s brojevima 1-6, a propilna skupina 7-9. Drugi se označava s brojevima 1'-6' i 7'-9'. Lignani su molekule kod kojih je prisutna 8-8' veza između dvije fenolpropanske jedinice, ostale molekule nazivaju se neolignanima (Teponno i sur., 2016). Lignani se nalaze u biljkama bogatim vlaknima kao što su zob, pšenica i ječam. Bogat izvor lignana je lan. Lignani pripadaju i skupini fitoestrogena te se mogu ponašati kao agonisti ili antagonisti estrogena, zbog čega se razmatra njihov potencijal za korištenje u svrhu zamjene hormonske terapije i prevencije raka (Touré i Xueming, 2010).

Porodica *Oleaceae* sadrži velik broj različitih derivata sekoiridoida. Sekoiridoidi su obično prisutni u obliku glikozida te sintetizirani sekundarnim metabolizmom terpena. Sekoiridoidima prisutnim u porodici biljaka *Oleaceae* svojstvena je prisutnost elenolne kiseline u glukozidnom ili aglikonskom obliku. Građeni su od pentil-etil alkohola (hidroksitirosola i tirosola), elenolne kiseline i često glukozidnog ostatka. Zaslužni su za gorčinu i pikantnost maslinovog ulja (Bendini i sur., 2007). Najznačajniji sekoiridoidi masline su oleozidi, od kojih su najzastupljeniji oleuropein i ligstrozid – esteri elenolne kiseline. Nalaze se u svim dijelovima ploda masline (Obied i sur., 2009). U djevičanskom maslinovom ulju sekoiridoidi dolaze u aglikonskom obliku, što je posljedica hidrolize glikozidnih oblika endogenom beta-glukozidazom (tijekom mljevenja i drobljenja). Također, tijekom skladištenja ulja može doći do daljnje razgradnje na jednostavnije fenolne spojeve poput tirosola i hidroksitirosola (Bendini i sur., 2007).

Oleuropein, najvažniji je glukozid među sekoiridoidima masline. Esterificiran je dihidroksi-pentil-etil alkoholom. Njegovi nusprodukti, demetil-oleuropein i oleozid metil ester indikatori su sazrijevanja plodova maslina. Njihova relativna količina u odnosu na oleuropein povećava se starenjem ploda, što je povezano s povećanjem aktivnosti hidrolitičkih enzima tijekom starenja biljke, posebice esteraza koje hidroliziraju esterske veze oleuropeina (Khan i sur., 2007).



Slika 2. Opća struktura sekoiridoida (Obied i sur., 2009).



Slika 3. Kemijska struktura oleuropeina (Xie i sur., 2015).

Fenolni spojevi masline lokalizirani su u pokožici i pulpi ploda. Njihov udio iznosi 1—3 % mase svježe pulpe (Charoenprasert i Mitchell, 2012). Prilikom proizvodnje djevičanskog maslinovog ulja većina fenolnih spojeva zaostaje u komini (i/ili vegetabilnoj vodi). Jedan od dominantnih fenolnih spojeva u plodu masline je oleuropein. Prilikom drobljenja ploda masline dolazi do enzimatske hidrolize oleuropeina pomoću enzima β -glukozidaze u hidroksitirosol i druge derivate sekoiridoida. Dominantni fenolni spojevi komine masline su hidroksitirosol, oleuropein, derivati oleuropeina, protokatehinska kiselina i 3,4-DPHEA-EDA (oleuropein-aglikon dialdehid). Ostali prisutni fenolni spojevi tirosol, kavaska kiselina, vanilin, vanilinska kiselina, luteolin, rutin, verbaskozid i apigenin (Araújo i sur., 2015).

2.5. Ekstrakcija fenolnih spojeva komine masline

Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala može se povoditi na različite načine. Zadnjih 20 godina razvijaju se nove, nekonvencionalne metode ekstrakcije. Takve su metode ekološki prihvatljivije zbog smanjene uporabe sintetskih i organskih otapala, kraćeg trajanja metode te boljeg iskorištenja i kvalitete ekstrakta. Kao nekonvencionalne metode

koriste se ultrazvučni valovi, pulsirajuće električno polje, mikrovalovi, omsko zagrijavanje, superkritični fluidi i ekstrakcija pod visokim tlakom. Konvencionalne metode ekstrakcije, kao što je ekstrakcija po Soxhletu, uzimaju se kao referentne metode za određivanje efikasnosti novih metoda u razvoju (Azmir i sur., 2013).

Glavni parametri koji utječu na proces ekstrakcije su svojstva matriksa biljnog materijala, svojstva otapala, temperatura, tlak i vrijeme ekstrakcije (Azmir i sur., 2013). Vrlo važno svojstvo je i polarnost otapala. Fenolni spojevi mogu biti polarni i nepolarni. Za njihovu se ekstrakciju najčešće koriste metanol, etanol, aceton i voda te njihove mješavine (Dent i sur., 2013). Dodatak vode poboljšava ekstrakciju, ali prevelik udio vode dovodi do ekstrakcije nekih drugih spojeva i manje koncentracije fenolnih spojeva (Tomsone i sur., 2012). Također, visoke temperature i alkalni medij mogu dovesti do degradacije fenolnih spojeva (Dent i sur., 2013).

Ekstrakcija pomoću mikrovalova relativno je nova metoda ekstrakcije. Temelji se na zagrijavanju polarnih otapala u kontaktu s krutim uzorcima te razdjeljivanju željenih komponenti između uzorka i otapala pomoću energije mikrovalova (Dahmoune i sur., 2015). Prednosti ove metode u odnosu na konvencionalne metode su uporaba manjeg volumena otapala, brža ekstrakcija, bolje iskorištenje te očuvanje termolabilnih komponenti. Naime, mikrovalovi dovode do zagrijavanja materijala uslijed ionske kondukcije i rotacije dipola. Ionska kondukcija odnosi se na gibanje iona, a rotacija dipola na zakretanje polarnih molekula (molekula koje posjeduju dielektrična svojstva) uslijed djelovanja promjenjivog elektromagnetskog polja. Tim gibanjem molekula dolazi do zagrijavanja materijala. Taj efekt dovodi do razaranja staničnih stjenki u biljnom materijalu te do izlaska staničnog sadržaja iz stanice (Tatke i Jaiswal, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Za izradu eksperimentalnog dijela rada korištena je komina maslina iz uljare Agrolaguna d.d., Poreč. Komina je odmah nakon proizvodnje ulja osušena na 60 °C i nakon toga usitnjena te je do analize čuvana na -18 °C.

3.2. Reagensi

Reagensi i otapala:

- Petroleter
- Metanol
- DIECE (natrijev dietilditiokarbamat)

Standardi fenolnih spojeva

- 2,4-dihidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- 4-hidroksibenzojeva kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Kavska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Klorogenska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Ferulinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Genska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Oleuropein (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *o*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Protokatehinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Siringinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Sinapinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Sirinaldehid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Tirosol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Vanilin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)
- Vanilinska kiselina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, SAD)

3.3. Metode rada

3.3.1. Određivanje udjela vode u komini

Udio vode u komini određen je metodom sušenja komine do konstantne mase prema HRN EN ISO 665:2004 metodi pri 103 °C. U aluminijsku posudicu izvagano je 5 g komine s točnošću od 0,001 g. Posudice u stavljene u sušionik na 2 h, zatim hladene u eksikatoru do sobne temperature i vagane. Sušenje se nastavlja dalje po 1 h do konstantne mase. Provedena su dva paralelna određivanja. Udio vode u komini određen je iz razlike masa komine i aluminijske posudice prije i nakon sušenja prema jednadžbi [1].

$$w(vode) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100[\%] \quad [1]$$

m_0 – masa prazne posudice (g)

m_1 – masa posudice s uzorkom prije sušenja (g)

m_2 – masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g)

3.3.2. Određivanje udjela ulja u komini

Udio ulja u komini određen je metodom HRN EN ISO 659:2010 ekstrakcije po Soxhletu. Provedena su dva paralelna određivanja. Izvagano je 10 g komine s točnošću od 0,001 g u celulozne čahure te su čahure zatvorene vatom kako se uzorak ne bi rasipao. Čahure su stavljene u ekstraktor aparature po Soxhletu. U izvaganu okruglu tikvicu s tri staklene kuglice za vrenje dodano je 100 mL petroletera. Ekstrakcija se provodila 8 h pri čemu se ekstrakt skupljao u tikvici. Nakon ekstrakcije, uklonjena je većina otapala iz tikvice, a preostali dio uklonjen je sušenjem. Sušenje je provedeno pri 103 °C 1 h. Tikvica je ohlađena u eksikatoru do sobne temperature i vagana. Zatim se postupak sušenja ponavlja tijekom 30 minuta do konstantne mase. Masa ulja u uzorku određuje se iz razlike masa tikvice s uzorkom nakon sušenja i mase prazne tikvice, a maseni udio ulja određuje se prema jednadžbi [2].

$$w(\text{ulja}) = \frac{m_1}{m_0} \times 100[\%] \quad [2]$$

m_1 – masa uzorka prije ekstrakcije (g)

m_2 – masa ulja ekstrahiranog iz uzorka (g)

3.3.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva metodom po Soxhletu

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz komine metodom po Soxhletu provedena je u četiri paralelna mjerenja prema metodi optimiranoj u diplomskom radu Cvitanić (2016). Korištena je aparatura po Soxhletu INKO d.o.o., Zagreb, Hrvatska. Izvagano je 5 g komine s točnošću od 0,0001 g u čiste papirnate čahure. Čahure su postavljene u ekstraktore aparature po Soxhletu. U tikvicu je stavljeno oko 170 mL metanola (malo više od tri volumena ekstraktora). Ekstrakcija je provedena 3 sata. Nakon ekstrakcije u tikvice je sakupljen cijeli volumen otapala. Iz svake tikvice je otpareno otapala do volumena manjeg od 100 mL pomoću rotacijskog uparivača. Otopine su kvantitativno prenesene u odmjerne tikvice od 100 mL preko lijevka. Tikvica i lijevak ispirani su metanolom. Nakon što su se otopine ohladile, tikvice su do oznaka nadopunjene korištenim otapalom. Mali volumeni otopina (2 mL) preneseni su u vijalice pomoću šprica i PVDF filtera s veličinom pora od 0,2 μm kako bi se pomoću HPLC-a odredila koncentracija i sastav fenolnih spojeva u uzorcima.

3.3.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva mikrovalovima

Ekstrakcija je provedena na mikrovalno-ultrazvučnom ekstraktoru/reaktoru (Lab Kits, Hong Kong, Kina) u četiri paralelna određivanja. Optimalni parametri ekstrakcije utvrđeni su metodom odzivnih površina (RSM) iz rezultata pokusa provedenih i objavljenih u diplomskom radu Cvitanić (2006). Optimiranje eksperimenta provedeno je u programu Design Expert v.10.

Izvagano je 5 g komine s točnošću od 0,0001 g u plastične kivete. Masa je kvantitativno prenesena u tikvicu za ekstrakciju mikrovalovima te je dodano 100 mL 60%-tnog metanola. Sadržaj se lagano promućkao te je tikvica postavljena u mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor. Ekstrakcija se provodila pri snazi od 298 W i vremenu od 8,1

minute. Nakon ekstrakcije vrući ekstrakt je centrifugiran na 15 minuta pri 5000 okretaja. Nakon centrifugiranja otopina je prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena do oznake korištenim otapalom. Alikvot ekstrakta je profiltriran kroz PDVF filter veličine pora 0,2 μm te je korišten za određivanje sastava i koncentracije polifenolnih spojeva na HPLC-u.

3.3.5. Određivanje fenolnih spojeva komine masline

Sastav fenolnih spojeva komine masline određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti Agilent Technologies HPLC serije 1200 sustava s binarnom pumpom, autosemplerom i DAD detektorom (Santa Clara, SAD). Razdvajanje spojeva provedeno je na nepolarnoj koloni Phenomenex C18 (Kinetex 150 mm x 4,6 mm, 2,6 μm , 100 Å). Uvjeti analize razvijeni su u diplomskom radu Cvitanić (2016). Upotrijebljene su dvije mobilne faze, čiji se volumni udio tijekom eluiranja mijenjao. Mobilna faza A sadrži 0,1 %-tnu vodenu otopinu mravlje kiseline, a mobilna faza B 0,1 %-tnu otopinu mravlje kiseline u metanolu. Protok mobilnih faza iznosio je 0,9 mL min⁻¹, kolona je termostatirana na 30 °C, a količina injektiranog uzorka iznosila je 5 μm . Kromatogrami spojeva snimljeni su pri 280 i 320 nm. Sastav fenolnih spojeva komine masline određen je usporedbom spektara i retencijskih vremena spojeva detektiranih u komini i standarda.

Kvantifikacija fenolnih spojeva u ekstraktima provedena je pomoću izrađenih baždarnih dijagrama fenolnih spojeva (tablica 2). Kvantifikacija neidentificiranih spojeva provedena je pomoću baždarnog dijagrama tirosola. Koncentracija fenolnih spojeva u suhoj tvari komine određena je prema jednadžbi [3].

Tablica 2. Jednadžbe pravaca standarda fenolnih spojeva

Fenolni spoj	Jednadžba pravca
Galna kiselina	$y=5,8320x-28,0180$
Protokatehinska kiselina	$y=4,1117x-6,3412$
Tirosol	$y=2,1123x-0,0230$
4-hidroksibenzojeva kiselina	$y=3,7364x+6,0794$
Klorogenska kiselina	$y=5,0322x-22,8580$
Vanilinska kiselina	$y=6,1304x+10,7640$
2,4-dihidroksibenzojeva kiselina	$y=4,2723x-31,1050$
Kavska kiselina	$y=6,4096x-7,7631$
Siringinska kiselina	$y=10,4510x+8,4763$
Vanilin	$y=10,9760x+26,1220$
Siringaldehid	$y=6,7564x+3,8571$
<i>p</i> -kumarinska kiselina	$y=12,7250x+35,9360$
Ferulinska kiselina	$y=9,9958x-0,5318$
Sinapinska kiselina	$y=2,9466x+5,4714$
<i>o</i> -kumarinska kiselina	$y=19,883x-8,2734$
Oleuropein	$y=0,5970x-0,1615$
<i>trans</i> -cimetna	$y=27,9900x+43,7380$

$$c(\text{spoja}) = \frac{x \times V}{m} \times 100 [\text{mg kg}^{-1}]$$

[3]

c – koncentracija spoja u komini (mg kg^{-1})

x – koncentracija spoja u ekstraktu ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

V – volumen ekstrakta (ml)

m – masa komine korištena za ekstrakciju (g)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Komina masline je, s obzirom na visoki udio fenolnih spojeva, nutritivno vrijedan nusproizvod industrije ulja i masti te kao takav dobar materijal za njihovu ekstrakciju. U ovom radu provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva komine masline pomoću konvencionalne metode ekstrakcije po Soxhletu te nove tehnologije ekstrakcije pomoću mikrovalova. Cilj ovog rada bio je usporediti dvije metode ekstrakcije s obzirom na njihovo iskorištenje te vrste ekstrahiranih pojedinačnih fenolnih spojeva i njihovih koncentracija. Optimalni parametri obiju metoda ekstrakcija, kao i parametri za određivanje sastava fenolnih spojeva pomoću HPLC-a, određeni su i validirani u diplomskom radu Cvitanić (2016).

4.1. Udio ulja i vode u komini masline

U ovom radu korištena je prethodno osušena komina masline. Naime, svježa komina masline sadrži visok udio vode, zbog čega je pogodan medij za rast i aktivnost mikroorganizama. Također, visok udio vode omogućava razne kemijske reakcije u materijalu te aktivnost enzima. Iz tih razloga nužno je provesti sušenje komine prije njenog skladištenja kako ne bi došlo do degradacije nutritivnih komponenti poput fenolnih spojeva (Herceg, 2009; Koprivnjak, 2006). Komina je osušena s 64 % do 3,73 % udjela vode, čime se osiguralo sigurno skladištenje do ekstrakcije. Iako je sušenje neophodan postupak u proizvodnji ekstrakta, u literaturi se navodi kako sušenjem komine masline ipak dolazi do značajne razgradnje fenolnih spojeva (ponajviše hidroksitirosola, tirosola, luteolina i oleuropeina). Suha komina sadrži čak upola manje ukupnih fenola od svježije komine (Šrajbek, 2017).

Tablica 4. Udio ulja i vode u osušenoj komini masline

Udio vode [%]	Udio ulja [%]	Udio ulja na suhu tvar [%]
3,73	9,27	9,63

Udio ulja u skladu je s podacima pronađenim u literaturi. Albuquerque i suradnici su u svom radu (2004) odredili sastav komina masline dobivenih centrifugalnom separacijom iz

maslina s različitih plantaža. Udio ulja u kominama varirao je od 7 do 19 %. Udio ulja u komini masline korištenoj u ovome radu od 9,63 % relativno je nizak u odnosu na podatke iz literature pa možemo zaključiti kako je postupak proizvodnje proveden dobro, odnosno postignuto je visoko iskorištenje.

4.2. Usporedba konvencionalne metode ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Metoda po Soxhletu razvijena je prvenstveno za ekstrakciju lipida, ali danas ima široku primjenu u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Najčešće je upotrebljavana konvencionalna metoda ekstrakcije. Njezini nedostaci su dugo vrijeme ekstrakcije, termička degradacija željenih spojeva, velika količina toplinske energije potrebna za proces i uporaba velike količine organskih otapala, koji imaju negativan utjecaj na okoliš (Tatke i Jaiswal, 2011). Kako bi se izbjegli ti nedostaci, razvijaju se i optimiraju nove metode, poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Naime, ekstrakcija mikrovalovima zahtjeva manji volumen otapala, daje bržu ekstrakciju i veće iskorištenje te sprječava degradaciju termolabilnih spojeva (Tatke i Jaiswal, 2011).

Ekstrakcija po Soxhletu provedena je kako bi se s njom mogla usporediti nova metoda ekstrakcije. Ekstrakcija je provedena tijekom 3 sata. Ekstrahirano je 5 g uzorka s metanolom pri temperaturi blizu vrelišta metanola 64,5 °C. Metanol je polarno organsko otapalo, koje dobro otapa fenolne spojeve (Tomsone i sur., 2012). Ovom metodom ekstrahirano je $3705,7 \pm 274,0$ mg kg^{-1} ukupnih fenola, od kojih je najzastupljeniji spoj pinoresinol, zatim hidroksitirosol, tirosol, vanilin i *p*-kumarinska kiselina. U manjoj mjeri je prisutna vanilinska kiselina (tablica 3). Također, iz podataka je vidljivo da nije ekstrahirano oleuropein, najznačajniji sekoiridoid masline, ali su u većoj mjeri prisutni njegovi razgradni produkti hidroksitirosol i tirosol. Neidentificirani spojevi prisutni su u najvećem udjelu. Ti spojevi najvjerojatnije spadaju u skupinu sekoiridoida, no nisu identificirani zbog nedostatka komercijalnih standarda.

Tablica 3. Koncentracije fenolnih spojeva (mg kg^{-1}) dobivene ekstrakcijama po Soxhletu i mikrovalovima

Fenolni spoj	Soxhlet	Mikrovalovi
Hidroksitirozol	125,2 \pm 126,8	158,4 \pm 10,1
Protokatehinska kiselina	0,0 \pm 0,0	80,6 \pm 1,4
Tirosol	122,1 \pm 20,1	197,6 \pm 9,1
Vanilinska kiselina	4,1 \pm 2,2	9,8 \pm 4,6
Vanilin	94,1 \pm 10,0	96,6 \pm 11,7
<i>p</i> -kumarinska kiselina	87,7 \pm 5,7	21,4 \pm 36,6
Pinoresinol	414,2 \pm 40,7	441,2 \pm 78,8
Neidentificirani spojevi	2796,8 \pm 187,5	3554,0 \pm 328,5
Ukupni	3705,7 \pm 274,0	4591,4 \pm 339,1

Rezultati ovog istraživanja razlikuju se od rezultata objavljenih u diplomskom radu Cvitanić (2016). U tom je radu ekstrahirano značajno više ukupnih fenolnih spojeva (11411,09 mg kg^{-1}), a kao najzastupljeniji spoj u komini određen vanilin u koncentraciji 1234,02 mg kg^{-1} . Prisutnost najzastupljenijih spojeva slična je u oba eksperimenta. To su pinoresinol, tirosol, hidroksitirozol i vanilin. Uzrok tomu je drukčiji fenolni sastav maslina, s obzirom na različitu godinu berbe, a samim time i na klimatske uvjete, vrijeme berbe i druge parametre (Koprivnjak, 2006; Belitz i sur., 2009).

Parametri ekstrakcije pomoću mikrovalova bili su trajanje od 8 minuta i snaga od 298 W te je kao otapalo korišten 60 %-tni metanol. Također je korišteno 5 g uzorka na 100 mL otapala. Ovom metodom ekstrahirano je 4591,4 \pm 339,1 mg kg^{-1} fenolnih spojeva, što je za otprilike 20 % više u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije. Najzastupljeniji su spojevi također pinoresinol, tirosol, hidroksitirozol i vanilin, a u manjoj mjeri zastupljeni, *p*-kumarinska i vanilinska kiselina. Također, ekstrahirana je protokatehinska kiselina, koja nije bila prisutna u ekstraktu dobivenom konvencionalnom metodom. Može se zaključiti kako je došlo do njezine degradacije konvencionalnom ekstrakcijom uslijed dugotrajnog zagrijavanja pri temperaturi od 60 °C. Ekstrakcijom mikrovalovima dobiveno je ~20 % veće iskorištenje u značajno manje vremena (vrijeme reducirano za otprilike 95 %) i uporabu manjeg volumena otapala. Trend povećanja koncentracije ekstrahiranih spojeva mikrovalovima u odnosu na konvencionalnu metodu podudara se s rezultatima diplomskog rada Cvitanić (2016).

Uspoređujući sastav fenolnih spojeva ekstrahiranih pomoću mikrovalova i konvencionalnom metodom pokazalo se da mikrovalovi povećavaju koncentraciju hidroksitirosola, tirosola, vanilinske kiseline, vanilina i pinoresinola, a smanjuju koncentraciju *p*-kumarinske kiseline. To može biti posljedica degradacije *p*-kumarinske kiseline pod utjecajem mikrovalova. Također, došlo je do ekstrakcije protokatehinske kiseline, koja se nije ekstrahirala metodom po Soxhletu.

Oleuropein nije ekstrahiran nijednom metodom ekstrakcije. U diplomskom radu Cvitanić (2016), također, nije ekstrahirano metodom po Soxhletu, ali je ekstrakcijom pomoću mikrovalova, što upućuje na njegovu slabu termičku stabilnost. Razlog zbog kojeg nije ekstrahirano u ovome radu pomoću mikrovalova vjerojatno je njegova niska početna koncentracija u samom plodu masline. Prema nekim znanstvenicima niža koncentracija oleuropeina, kao i viša koncentracija hidroksitirosola i tirosola (koji se smatraju razgradnim produktima oleuropeina) u ekstraktima upućuju na veću fiziološku starost masline (Bendini i sur, 2007). No drugi znanstvenici nisu utvrdili povezanost stupnja zrelosti i visokog udjela hidroksitirosola i/ili visokog omjera udjela hidroksitirosola prema oleuropeinu (Vinha i sur, 2005). Prema tome, nije moguće sa sigurnošću utvrditi da su hidroksitirosol i tirosol nastali degradacijom oleuropeina. Također, sušenjem komine maslina dolazi do razgradnje fenolnih spojeva, među kojima i oleuropeina (Šrajbek, 2017), što je vjerojatno dodatno smanjilo njegov udio u uzorku.

Iz rezultata istraživanja vidljivo je da je metodom ekstrakcije pomoću mikrovalova ekstrahirano više ukupnih fenolnih spojeva u odnosu na konvencionalnu metodu, što može biti posljedica efekta mikrovalova na biljni materijal. Naime, djelovanjem mikrovalova na biljni materijal dolazi do razaranja staničnih stijenki te izlaska staničnog sadržaja, time stanični sadržaj postaje dostupniji otapalu zbog čega dolazi do brže i bolje ekstrakcije (Tatke i Jaiswal, 2011). Odnosno, osim smanjenja vremena ekstrakcije i smanjenja volumena organskog otapala, dolazi i do povećanja iskorištenja ekstrakcije, što se podudara s rezultatima diplomskog rada Cvitanić (2016). Također, omogućeno je očuvanje termolabilnih komponenti zbog smanjenog trajanja ekstrakcije pri istoj temperaturi.

Slični podaci dobiveni su u istraživanju provedenom na crvenoj kadulji. Uspoređene su konvencionalne metode ekstrakcije i mikrovalna ekstrakcija diterpena tanshinona iz crvene kadulje. Ekstrakcijom mikrovalovima ekstrahirana je slična koncentracija tanshinona za značajno manje vremena (2 min) u odnosu na konvencionalne metode: metoda po

Soxhletu (90 min), ekstrakcija pri sobnoj temperaturi (24 h), ekstrakcija uz pomoć povratnog hladila (45 min) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (75 min) (Pan i sur., 2002).

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Ekstrakcijom mikrovalovima postignuto je ~20% veće iskorišćenje procesa ekstrakcije u odnosu na konvencionalnu metodu ekstrakcije po Soxhletu pri značajno kraćem trajanju ekstrakcije (za ~95%) i uporabi manjeg volumena otapala.
2. U komini masline u značajnom udjeli prisutni su pinoresinol, tirosol, hidroksitirosol, vanilin, *p*-kumarinska kiselina i protokatehinska kiselina. Najzastupljeniji spojevi su neidentificirani fenolni spojevi, koji vjerojatno spadaju u skupinu sekoiridoida.
3. Ekstrakcijom mikrovalovima povećala se koncentracija hidroksitirosola, tirosola, vanilinske kiseline, vanilina i pinoresinola, a smanjila koncentracija *p*-kumarinske kiseline te je ekstrahirana protokatehinska kiselina, koja nije detektirana u ekstraktima dobivenim konvencionalnom metodom.
4. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima može se koristiti kao dobra zamjena za konvencionalne metode ekstrakcije polifenolnih spojeva iz komine maslina, i pogodnija je za ekstrakciju termolabilnih spojeva.

6.LITERATURA

Albuquerque J. A., González J., García D., Cegarra J. (2004) Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresources Technology* **91**: 195 – 200.

Araújo M., Pimentel F., Alves R. C., Oliveira M.B.P.P. (2015) Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology* **45**: 200 – 211.

Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* **117**: 426 – 436.

Balbino S. (2014) Interna skripta iz kolegija Sirovine prehrambene industrije, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. str. 6-7.

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2009) Food Chemistry, 4. izd., Springer. str. 822 - 825.

Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gómez-Caravaca A. M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Lercker G. (2007) Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade, *Molecules* **12**: 1679-1719.

Boskou D., Blekas G., Tsimidou M. (2006) Olive Oil Composition. U: Olive oil, 2. izd., Boskou D., ur., AOCS Press. str. 41 - 75.

Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317 -333.

Brlek Savić T., Voća N., Krička T., Jurišić V. (2009) Komina masline kao izvor energije. *Glasnik Zaštite Bilja* **33**: 13 - 18.

Cardoso S. M., Guyot S., Marnet N., Lopes-da-Silva J. A., Renard C. M. G. C., Coimbra M., A. (2005) Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry, *J. Sci. Food Agric.*, 85:21–32, DOI: 10.1002/jsfa.1925

Charoenprasert S., Mitchell A. (2012) Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 7081–709.

Cvitanić M. (2016) Izolacija fenolnih spojeva iz komine masline, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 174 – 181.

Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K. (2015) Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. Leaves. *Food Chemistry* **166**: 585 - 595.

Dent M., Dragović-Uzelac, V., Penić M., Brnčić M., Bosiljkov T., Levaj B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology* **51**: 84 – 91.

Fabbri A., Hormaza J. I., Polito V. S. (1995) Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**: 538 - 542.

Frega N., Mozzon M., Lercker, G. (1999) Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**: 325 - 329.

Herceg Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane, Golden marketing - Tehnička knjiga Zagreb. str. 179 - 180.

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice - Određivanje udjela ulja (osnovna referentna metoda).

HRN EN ISO 665:2004, Uljarice - Određivanje količine vode i hlapljivih tvari.

Kabera J., Semana E., Mussa AR., He X. (2014) Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**: 377 - 392.

Khan Y., Panchal S., Vyas N., Butani A., Kumar V. (2007) *Olea europaea*: A Phyto-Pharmacological Review. *Pharmacognosy Reviews* **1**: 114- 118.

Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* **18**: 2328 - 2375.

Koprivnjak O. (2006) Djevičansko maslinovo ulje – Od masline do stola, MIH. str. 7-12.; 26-37.; 77-106.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**: 727 – 747.

Obied H., Prenzler P., Ryan D., Servili M., Taticchi A., Esposto S., Robards K. (2009) Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural product reports* **25**: 1167 - 1179.

Pan X., Niu G., Liu H. (2002) Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* bunge. *Biochemical Engineering Journal* **12**: 71–77.

Pereira A. P., Ferreira I. C. F. R., Marcelino F., Valentão P., Andrade P. B., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J. A. (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* **12**: 1153 - 1162.

Škevin, D. (2016) Interna skripta za kolegij Kemija i tehnologija ulja i masti, Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. str. 62-69.

Šrajbek Ž. (2017) Utjecaj procesa sušenja i odabira otapala na ekstraktibilnost fenolnih spojeva komine maslina, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tatke P., Jaiswal Y. (2011) An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Research Journal of Medicinal Plants* **5**: 21 - 31.

Teponno R. B., Kusari S., Spiteller M. (2016) Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural Product Reports* **33**: 1044 - 1092.

Tomsone L., Kruma Z., Galoburda R. (2012) Comparison of Different Solvents and Extraction Methods for Isolation of Phenolic Compounds from Horseradish Roots (*Armoracia rusticana*). *World Academy of Science, Engineering and Technology: International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* **6**: 236 - 241.

Tortosa G., Albuquerque J. A., Ait-Baddi G., Cegarra J. (2012) The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste ("alperujo"). *Journal of Cleaner Production* **26**: 48 - 55.

Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews* **18**: 98 – 112.

Uredba komisije (EEZ) br. 2568/91 o karakteristikama maslinovog ulja i ulja komine maslina te o odgovarajućim metodama analize (1991) *Službeni list Europske Komisije* **248**.

Vinha A. F., Ferreres F., Silva B. M., Valentão P., Gonçalves A., Pereira J. A., Oliveira M. B., Seabra R. M., Andrade P. B. (2005) Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry* **89**: 561 – 568.

Xie P., Huang L., Zhang C., You F., Wang C., Zhou H. (2015) Reduced-Pressure Boiling Extraction of Oleuropein Coupled with Ultrasonication from Olive Leaves (*Olea europaea* L.). *Advances in Materials Science and Engineering* **2015**: 1-8.

Touré A., Xueming X. (2010) Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**: 261 – 269.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Natana Božić

ime i prezime studenta